

150

Clermont Ferrand
1972

EXTRAIT DES

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

(Juin 1970, tome 118.)

ÉTUDE DE L'INFECTION DE LA LIGNÉE GERMINALE
CHEZ DES DROSOPHILES FEMELLES INJECTÉES
AVEC LE VIRUS SIGMA

I. — ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES DIVERSES CATÉGORIES
DE DESCENDANTS ET DE CYSTES INFECTÉS

PAR

J.-C. BREGLIANO

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS



ÉTUDE DE L'INFECTION DE LA LIGNÉE GERMINALE CHEZ DES DROSOPHILES FEMELLES INJECTÉES AVEC LE VIRUS SIGMA

I. - ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES DIVERSES CATÉGORIES DE DESCENDANTS ET DE CYSTES INFECTÉS (*)

par J.-C. BREGLIANO

(Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences, 63-Clermont-Ferrand)

SUMMARY

In the females of *Drosophila melanogaster* injected with sigma virus (responsible for CO₂ sensitivity) there are 3 types of ovarian egg-chambers (stage 10) which differ in their yield of infecting units.

The evolution of the relative frequency of these three types during the females life leads us to discuss the mechanism of germ line infection in injected females.

INTRODUCTION

Dans un travail précédent, nous avons comparé les quantités d'unités infectantes (U. I.) contenues dans les cystes ovariens des femelles stabilisées et des femelles injectées avec σ [1].

Nous avons observé que, chez les femelles d'une souche stabilisée — chez lesquelles le virus est installé de façon permanente dans la lignée germinale — les cystes ovariens contiennent tous une quantité importante d'U.I. Celle-ci varie avec les stades de l'ovogénèse et le rendement maximal est fourni par les cystes au stade 10B (nomenclature de King, Robinson et Smith [11]).

(*) Manuscrit reçu le 9 octobre 1969.

Chez les femelles infectées par inoculation, seule une fraction des cystes est virosée, ce qui correspond au fait que ces femelles ne transmettent le virus qu'à une partie de leurs descendants (phénomène dit « passage au germen »). Rappelons que ces descendants sensibles peuvent être répartis en trois catégories : les non-stabilisés, les néo-stabilisés et les mosaïques germinales. Or, au stade 10B les cystes se répartissent en trois classes de rendement, dont la plus élevée est tout à fait comparable à la classe unique trouvée chez les femelles stabilisées. On est alors tenté de penser que ces trois classes de rendement correspondent aux trois catégories de descendants sensibles.

Si nous pouvions montrer qu'une telle correspondance existe réellement, nous arriverions à d'intéressantes conclusions concernant l'installation et la perpétuation de l'état stabilisé. C'est ce que nous nous sommes proposé de faire.

Dans cet article nous montrons comment évoluent, au cours de l'âge des femelles, les 3 catégories de descendants infectés ainsi que les 3 classes de cystes virosés. Les résultats nous amèneront à proposer certaines idées concernant le mécanisme du passage au germen. Nous aborderons brièvement le problème de la correspondance entre les classes de cystes et les catégories de descendants ; nous y reviendrons d'une manière beaucoup plus détaillée dans une publication ultérieure. Nos résultats nous conduiront alors à proposer une hypothèse relativement simple et satisfaisante concernant l'installation et la transmission de l'état stabilisé.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

En ce qui concerne les cystes ovariens, les techniques de dissection et la méthode de dosage des U.I. ont été décrites dans une publication antérieure [4]. Nous nous contenterons ici de rappeler brièvement le déroulement de l'ovogénèse.

Au sommet de l'ovariole se trouve le germarium dans lequel une ou deux ovogonies génératrices vont donner naissance à des cystoblastes. Chacun de ceux-ci va subir 4 mitoses consécutives pour aboutir à un groupe de 16 cellules dont l'une deviendra l'ovocyte et les autres les cellules nourricières. Chaque groupe de 16 cellules sera entouré d'une couche de cellules folliculaires et se détachera du germarium pour donner un cyste ovarien bien individualisé. Rappelons que les cellules folliculaires ont une origine embryologique tout à fait indépendante de la lignée germinale. Ce cyste évoluera jusqu'à l'œuf mûr à travers une série de transformations que King, Rubinson et Smith [41] ont décomposée en 14 stades morphologiques. D'après Koch et King [42] à tout moment un ovariole comprend 6 ou 7 de ces cystes et 10 cystes en préparation dans le germarium répartis comme suit de la base vers le sommet : 6 groupes de 16 cellules, 1 groupe de 8 cellules, 1 groupe de 4 cellules, 1 groupe de 2 cellules, 1 cystoblaste.

On a donc toujours dans un ovariole en fonctionnement normal 16 cystes ovariens en voie de développement. D'après King et coll. il faut, à 25°C, 8 jours pour passer du cystoblaste à l'œuf pondu, avec un rythme de ponte de 2 œufs par jour et par ovariole. A 20°C, ce rythme est à peu près deux fois plus faible, ce qui implique un temps de développement deux fois plus long. Ceci est en accord avec les données recueillies par Brun [4].

Nous avons été amenés à plusieurs reprises à déterminer la fréquence des trois catégories de mouches sensibles parmi la descendance des femelles injectées. Le critère essentiel qui distingue les trois types est basé sur les modalités de la

transmission du virus à la descendance. Rappelons tout d'abord que cette transmission ne suit pas les mêmes règles chez les mâles et chez les femelles. Nous nous intéressons ici uniquement à ces dernières car la souche virale utilisée étant du type v^- , la descendance d'un mâle est toujours entièrement résistante quelle que soit la catégorie à laquelle il appartient [5].

Pour pouvoir distinguer les trois catégories, nous avons, avant de recueillir les descendants à soumettre au test du CO_2 , placé les femelles pondeuses à 30° C pendant 3 jours. Dans ces conditions le passage au germen est supprimé et les différences entre les 3 types deviennent particulièrement nettes ; les non-stabilisés donnent une descendance entièrement résistante, les stabilisés une descendance entièrement sensible et les mosaïques une descendance mixte.

Le protocole expérimental utilisé est le suivant. Les filles des femelles injectées sont isolées individuellement dans des tubes d'élevage 2 à 3 jours après l'émergence imaginale, 2 ou 3 mâles sans virus leur sont adjoints, puis les tubes sont placés pendant trois jours à 30° C. A partir du retour à 20° C la ponte est recueillie pendant une période de 3 à 6 jours (variable selon les expériences). Les femelles pondeuses sont ensuite soumises au test du CO_2 ; seule la ponte des femelles sensibles est gardée. Quelques jours après leur éclosion, les imagos issues de ces pontes sont à leur tour soumises au test et les femelles pondeuses réparties dans les trois catégories selon la réponse donnée par leurs descendants. Une incertitude subsiste toutefois pour les femelles dont une faible fraction de la descendance est sensible (jusqu'à 10 p. 100). Elles peuvent être, soit des mosaïques germinales, soit des non-stabilisées dont le passage au germen n'a pu être entièrement supprimé. Cette dernière éventualité nous paraissant plus plausible, nous avons classé ces femelles parmi les non-stabilisées, mais il est évident que nous ne saurions considérer ce classement comme certain.

En ce qui concerne la souche virale utilisée, rappelons qu'elle a été choisie initialement en raison de la stabilité génétique de son type dimensionnel (1) peu fréquente chez le virus σ . Ceci nous permet de comparer des dosages effectués à de longs intervalles de temps. Il est apparu que pour les expériences relatées ici cette souche présente un inconvénient dont nous avons déjà parlé : le caractère v^- . Le fait de n'avoir pu distinguer les trois catégories d'individus virosés parmi les descendants mâles des femelles injectées a réduit de moitié notre échantillonnage, donc diminué la précision de nos résultats. Nous n'avions pourtant d'autre ressource que de continuer le travail avec la même souche, sous peine de recommencer toutes les expériences effectuées antérieurement.

Les mouches injectées appartenaient toutes au type de référence habituellement utilisé au laboratoire, il s'agit de descendants de première génération d'un croisement de femelles *sepia* et de mâles *ebony*.

Le milieu d'élevage utilisé est celui qu'a décrit David [6].

PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

Dans une première expérience nous avons inoculé un extrait infectieux contenant un clone viral à un lot d'une cinquantaine de *Drosophiles* femelles âgées de 2 à 3 jours. Après un délai de 9 jours, celles-ci ont été isolées individuellement dans des tubes d'élevage, chacune avec deux mâles, puis transvasées régulièrement sur milieu neuf tous les 3 ou 4 jours.

Pendant 2 périodes, du 13^e au 21^e jour, puis du 27^e au 29^e, des dissections

(1) Type dimensionnel : type viral caractérisé par la dimension de la plage, c'est-à-dire le nombre moyen de jours nécessaires pour qu'un lot de mouches de référence inoculées avec un clone viral, dans des conditions normalisées, devienne sensible au CO_2 [4]. Il mesure donc en quelque sorte la virulence.

de femelles ont été pratiquées journallement, afin de récupérer les cystes au stade 10 B. La quantité d'U.I. contenue dans chacun d'eux a alors été dosée. En tout 137 cystes, prélevés sur 25 individus, ont été examinés. Les femelles restantes ont été transvasées régulièrement jusqu'à leur mort. Une douzaine d'entre elles, ayant vécu au moins un mois, ont été choisies pour étudier l'évolution des fréquences relatives des trois catégories de descendants infectés, au cours des pontes successives, afin de la comparer à l'évolution des fréquences relatives des 3 classes de cystes 10 B virosés. La fréquence des individus sensibles au CO_2 dans les descendance de ces douze femelles était relativement faible, ce qui nous a obligé à grouper les résultats des douze descendance pour avoir des données statistiquement valables. Il nous a semblé intéressant de chercher à obtenir des informations comparables sur les descendance de femelles individuelles. Il fallait pour cela choisir des mouches injectées donnant un fort pourcentage de descendants virosés ce qui ne peut se faire qu'à posteriori. Ceci nous a amené à réaliser une seconde expérience de la manière suivante.

Nous avons préparé un extrait viral à partir de descendants infectés issus de la première expérience. Trente femelles sans virus ont été injectées avec cet extrait, puis placées chacune dans un tube d'élevage avec trois mâles renouvelés tous les 15 jours.

Tous les 3 ou 4 jours, nous transvasions ces mouches sur du milieu neuf, toutes les pontes étant conservées. La grande majorité d'entre elles n'ont donné qu'un pourcentage de descendants infectés relativement faible et n'ont donc pu être utilisées pour l'expérience projetée. Trois cependant se distinguaient par un pourcentage maximal supérieur à 70. Dans celles-ci nous avons dénombré les trois catégories de mouches virosées selon la technique déjà décrite. Deux des femelles injectées ont pu être disséquées après leur mort, l'une, portant l'indicatif « E », possédait 46 ovarioles ; l'autre, dénommée « A », en possédait 45.

Pour compléter les données obtenues antérieurement, nous avons également dosé la quantité d'U.I. contenue dans les cystes 10 B de femelles stabilisées pour la même souche virale et âgées de 3 à 5 jours.

RÉSULTATS

I. — RÉSULTATS CONCERNANT LES CYSTES OVARIENS

L'histogramme des rendements en U.I. fournis par les cystes de femelles stabilisées est présenté sur la figure 1. Nous avons groupé les résultats de l'expérience décrite ci-dessus avec ceux de l'expérience antérieure déjà publiée [4], qui avait été faite avec des femelles âgées de 15 à 20 jours ; on voit que la répartition s'étend de 2,6 à plus de 4 unités logarithmiques.

Les rendements des cystes de femelles injectées sont présentés sur le graphique inférieur de cette même figure. Il faut signaler que nous avons trouvé, comme lors des expériences précédentes, une certaine quantité de cystes à rendement très faible compris entre 0 et 0,8 unités logarithmiques. Nous ne les avons pas reportés sur le graphique afin de ne pas le compliquer. Nous avons déjà expliqué [4] pourquoi nous ne pouvions prendre en consi-

dération ces cystes très pauvres en U.I. qui correspondent sans doute à une contamination accidentelle du broyat de cystes non infectés. Nous retrouvons encore 3 classes de rendement, bien que cette situation soit plutôt moins nette que lors des expériences antérieures. La classe de rendements la plus élevée (que nous nommerons « A ») correspond à des valeurs comprises entre 2,6 et 4,5 unités log. La classe des rendements faibles (C) correspond aux

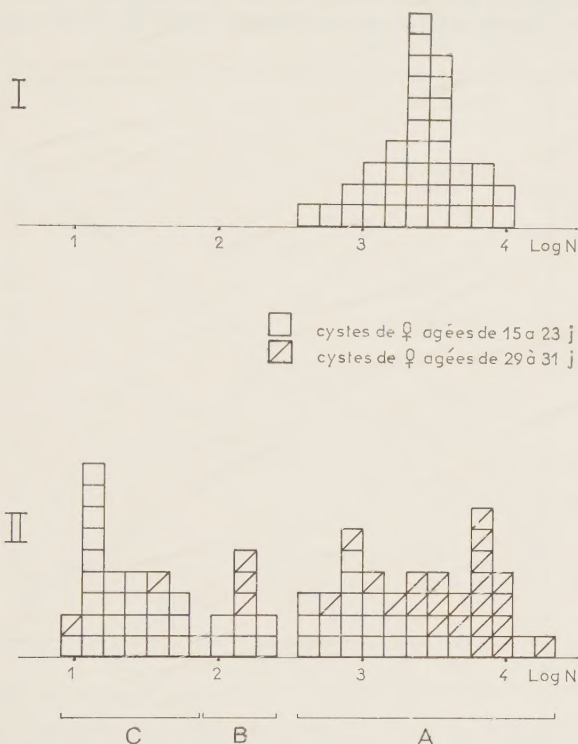


FIG. 1. — Diagramme I : Distribution des rendements en U.I. des cystes au stade 10 B de femelles stabilisées. — Diagramme II : Distribution des rendements en U.I. des cystes au stade 10 B de femelles injectées.

valeurs comprises entre 1 et 1,8 ou 1,9 unités log. La classe intermédiaire (B) se situe entre 1,9 et 2,5 unités log avec un mode à 2,2. La classe A semble elle-même présenter une distribution bimodale, mais ceci correspond très nettement à l'existence de deux classes d'âge pour les femelles. Le mode aux alentours de 2,9 unités log est donné par des cystes prélevés sur les femelles de 15 à 20 jours d'âge et le mode aux alentours de 3,8 unités log donné par des cystes de femelles âgées de 29 à 31 jours.

Sur la figure 2, nous avons représenté l'évolution des fréquences relatives des trois classes de rendements en fonction de l'âge des mouches en nombre de jours après l'injection. Pour cela nous avons groupé les résultats en trois

tranches d'âge. La première comprend les cystes prélevés sur les femelles âgées de 13, 14 et 15 jours ; la troisième correspond aux cystes de femelles âgées de 27, 28 et 29 jours. Sur cette figure nous avons représenté séparément l'évolution des trois catégories A, B et C. Remarquons que la catégorie B étant très faible numériquement, ses fréquences ne sont connues qu'avec une erreur très importante.

Il apparaît que la fréquence relative de la catégorie A s'accroît considérablement au cours de la vie de la mouche ; elle passe de 0,35 dans la pre-

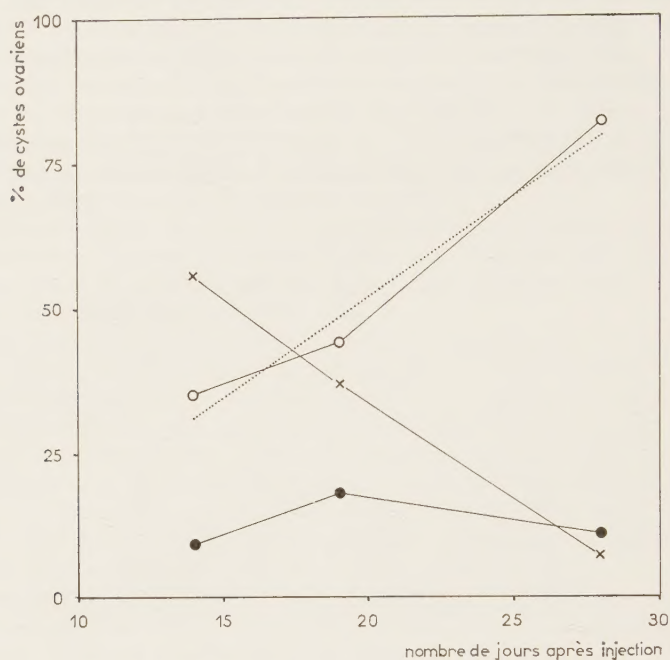


FIG. 2. — Evolution au cours du temps des fréquences relatives des 3 classes de cystes 10 B chez les femelles injectées. ○ classe A ; ● classe B ; × classe C. --- droite de régression pour la classe A.

mière tranche à 0,82 dans la dernière. Le χ^2 d'homogénéité effectué sur les effectifs de ces deux tranches est égal à 12, ce qui correspond, avec 1 degré de liberté, à un seuil de probabilité inférieur à 0,001. La pente de la droite de régression donnée par cette catégorie de cystes est de 3,4. Elle est évidemment entachée d'une erreur très importante puisqu'elle est calculée avec trois points seulement.

II. — RÉSULTATS CONCERNANT LES DESCENDANTS

a) *Première expérience* : Nous avons déjà dit que le faible nombre de descendants sensibles fournis par les douze femelles étudiées rendait impossible l'étude individuelle des descendance. Nous avons donc groupé les résultats.

Sur la figure 3 sont représentées, d'une part l'évolution du rythme de ponte moyen, d'autre part l'évolution du pourcentage de descendants infectés (courbe du passage au germen). Le nombre moyen d'individus de ce type contenus dans la descendance globale d'une femelle est de 67. Le nombre moyen d'ovarioles chez les femelles utilisées étant de 21 par ovaire (moyenne établie sur 31 ovaires), il en résulte que chaque ovariole donne naissance en moyenne à 1,6 descendants infectés. Cette valeur est légèrement sous-estimée car un certain nombre d'ovarioles deviennent non fonctionnels chez

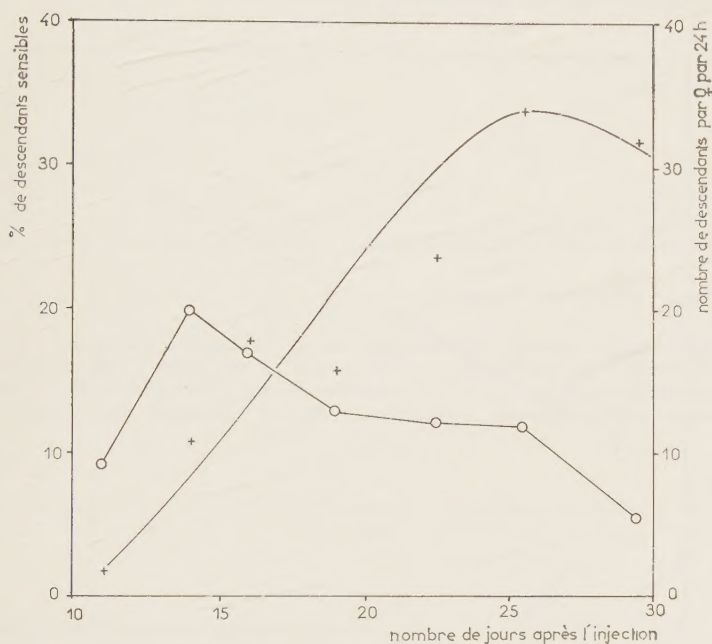


FIG. 3. — Evolution de la ponte et de la fréquence des descendants sensibles du lot de douze femelles injectées. —○— nombre de descendants par ♀ et par 24 heures ; —+— fréquence des descendants sensibles.

les femelles âgées (David [7]); ce nombre est cependant toujours restreint chez les mouches que nous utilisons, qui bénéficient de la vigueur hybride.

L'évolution, au cours du temps, de la fréquence des individus néostabilisés parmi les descendants sensibles est représentée sur la figure 4. Nous voyons qu'elle croît régulièrement du 12^e au 30^e jour après l'inoculation ; elle passe de 0,32 à 0,80 et la droite de régression a une pente égale à 2,7.

Pour cette première expérience nous n'avons pas cru utile de représenter séparément l'évolution des fréquences des descendants non-stabilisés et mosaïques ; d'une part parce que ces derniers restent toujours rares, d'autre part parce que, comme nous l'avons signalé plus haut, le classement d'un individu dans l'une ou l'autre de ces catégories est quelquefois incertain.

b) *Seconde expérience* : Nous avons rassemblé sur la figure 5 les données relatives à la femelle E et sur la figure 6 les données relatives à la femelle A. Sur chacune nous avons représenté l'évolution des grandeurs suivantes :

- nombre d'œufs pondus en 24 heures ;
- pourcentage de descendants sensibles ;
- pourcentage de descendants néostabilisés ;
- pourcentage de descendants mosaïques ;
- pourcentage de descendants non stabilisés ;

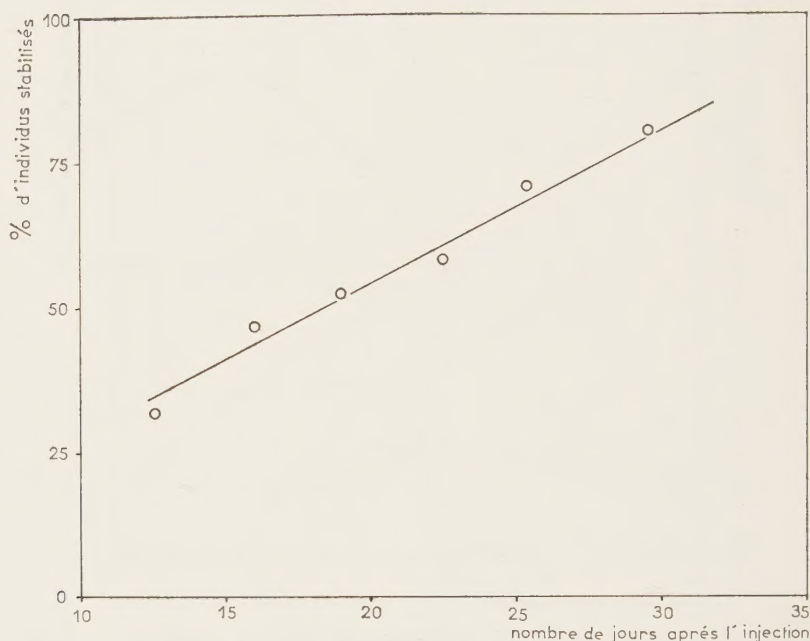


FIG. 4. — Evolution au cours d'un passage au germen de la fréquence des individus stabilisés parmi les descendants sensibles.

les trois derniers étant calculés dans la fraction infectée de la descendance seulement.

Nous voyons que dans les deux cas, l'évolution des descendants néostabilisés est analogue à celle que nous avons observée dans la première expérience. La fréquence des descendants mosaïques semble croître au début ou tout au moins rester à peu près constante, puis décroît comme celle des non stabilisés. N'oublions pas cependant que la distinction entre ces deux catégories est quelque peu imprécise.

Le nombre total des descendants sensibles fourni par ces deux femelles est relativement élevé. La femelle E en a donné 316, ce qui fait en moyenne 6,9 par ovariole ou 7,5 œufs infectés si l'on tient compte du pourcentage

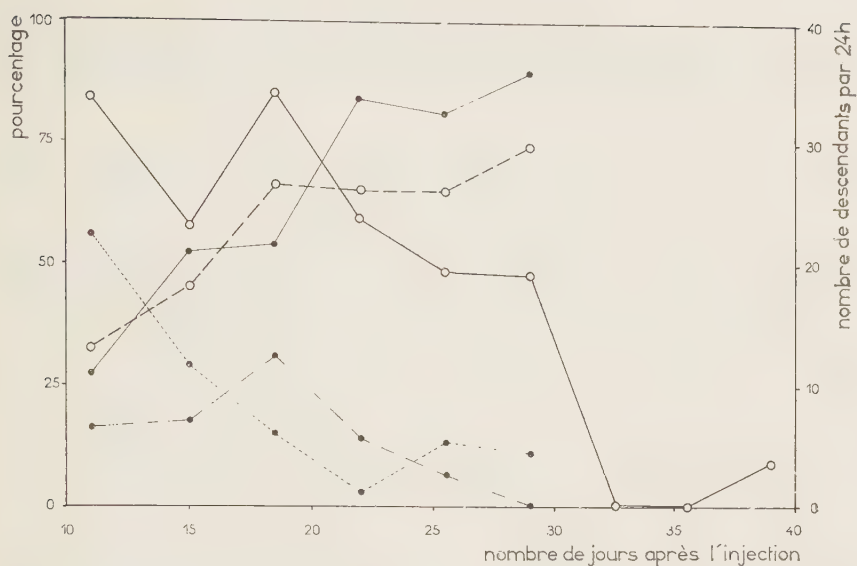


FIG. 5. — Résultats fournis par la descendance d'une femelle injectée (E) —○— nombre de descendants par 24 h ; —○— fréquence des descendants sensibles ; —●— fréquence des descendants stabilisés ; --●-- fréquence des descendants non stabilisés ; --●-- fréquence des descendants mosaïques.

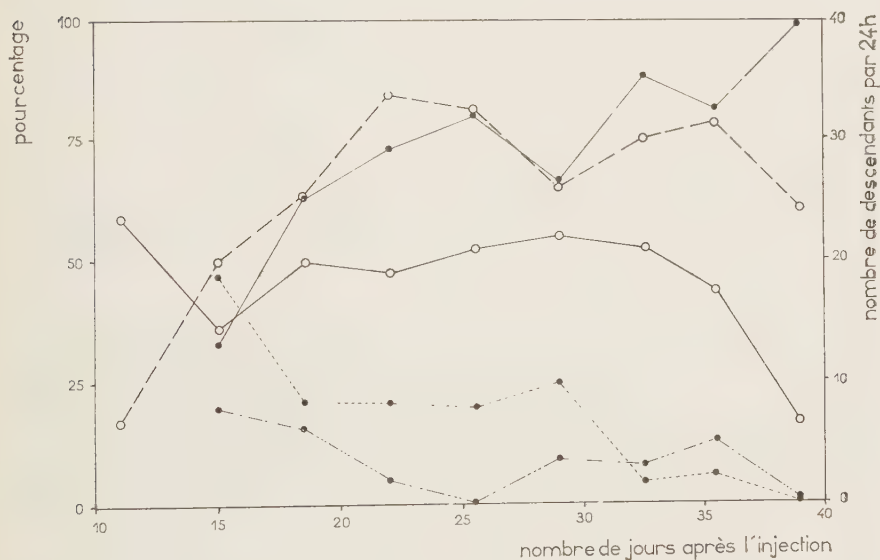


FIG. 6. — Résultats fournis par la descendance d'une femelle injectée (A) (même représentation que pour la fig. 5).

d'éclosion égal à 90 p. 100. La femelle A en a donné 324, ce qui correspond à une production de 7,9 œufs infectés par ovariole. Ici encore, ne connaissant pas le nombre d'ovarioles réellement fonctionnels, nous sous-estimons légèrement ces moyennes.

III. — COMPARAISON STATISTIQUE ENTRE LES CATÉGORIES DE DESCENDANTS SENSIBLES ET LES CLASSES DE RENDEMENT DES CYSTES

Nous sommes en possession de données sur les cystes ovariens recueillis dans trois tranches de temps bien délimitées et de données sur la descendance recueillie tout au long de la vie des femelles pondeuses.

Pour que les comparaisons soient valables, il est nécessaire de rechercher parmi la descendance les tranches de temps qui correspondent à celles des cystes.

Nous devons pour cela tenir compte du décalage de temps existant entre un cyste au stade 10B et la ponte de l'œuf issu de ce cyste. Il se trouve toutefois que l'estimation précise de ce décalage soulève de nombreuses difficultés. D'après King, il serait environ de 10 heures à 25° C chez des drosophiles pondant en moyenne 2 œufs par jour et par ovariole. Le rythme de ponte moyen chez les femelles de la première expérience, compte tenu du pourcentage d'éclosion égal à 90 p. 100 peut être estimé à 0,5 œuf par jour et par ovariole vers le 14^e jour après l'injection. L'ovogénèse est donc à ce moment-là 4 fois plus lente que chez les femelles observées par King. Sur la base de ces résultats nous serions conduits à estimer à une quarantaine d'heures l'intervalle de temps qui s'écoule entre le stade 10B et la ponte. Cet intervalle s'accroît avec l'âge des mouches ; si l'on ne tenait compte que de l'évolution du rythme de ponte, on pourrait l'estimer à 60 heures vers le 20^e jour et à environ 120 heures vers le 30^e jour après l'injection.

Il semble cependant que ces chiffres soient surestimés et ceci pour deux raisons :

a) La diminution du rythme de ponte au cours de la vie n'est pas due seulement au ralentissement général de l'ovogénèse, mais aussi à la diminution du nombre d'ovarioles fonctionnels et à la baisse du pourcentage d'éclosion des œufs [7]. N'ayant pas tenu compte de ces deux facteurs dans nos estimations (nous ne possédons aucune donnée numérique les concernant) nous avons surestimé le ralentissement de l'ovogénèse, surtout chez les femelles âgées de 30 jours.

b) Nos estimations s'appuient sur les données de King [9]. Cet auteur, à partir des fréquences avec lesquelles se rencontrent les différents stades de l'ovogénèse dans les ovaires, a estimé la durée de chacun d'eux. Il trouve notamment que le stade 14, qui précède la ponte, dure plus de 9 h 30 à 25° C donc environ 1/8 du temps qui s'écoule entre le stade 1 et la ponte. Or il semble que chez les femelles que nous utilisons, le stade 14 ait une durée relative beaucoup plus courte, de l'ordre de 1/3 de la durée estimée par cet auteur (manuscrit en préparation).

Cette différence avec les résultats de King tient sans doute au fait qu'il a fait ses observations sur des femelles vierges, connues pour retenir les œufs mûrs dans l'ovaire beaucoup plus longtemps que les femelles fécondées.

Mentionnons encore une cause d'erreur dans l'estimation de cet intervalle de temps, erreur qui nous conduit cette fois à le sous-estimer. Il s'agit du ralentissement des cystes ovariens virosés dont nous aurons l'occasion de reparler.

Nous ne possédons donc finalement aucune donnée sûre pour estimer avec précision le temps qui s'écoule entre le stade 10B et la ponte. Nous avons alors choisi des tranches de ponte relativement larges, de façon que leurs limites encadrent les limites des tranches de cystes broyés. La variation des fréquences des 3 catégories de descendants n'étant pas très rapide, procéder ainsi n'entraîne pas beaucoup d'erreurs.

Ainsi les cystes broyés entre 13^e et le 15^e jour seront comparés aux pontes comprises entre le 13^e et le 17^e jour. Ceux qui ont été broyés entre le 17^e et le 21^e jour seront comparés aux pontes comprises entre le 17^e et le 24^e jour. Enfin les cystes broyés entre le 27^e et 29^e jour seront comparés aux descendants issus des pontes du 27^e au 32^e jour.

Les effectifs et pourcentages concernant les descendants sont représentés dans le tableau I, ceux qui concernent les cystes dans le tableau II.

TABLEAU I. — Résultats obtenus sur les descendance de femelles injectées avec σ . Evolution de diverses catégories de descendants au cours de 3 tranches de temps successives.

	1 ^{re} TRANCHE	2 ^e TRANCHE	3 ^e TRANCHE
Nombre total de descendants (D)	461	501	177
Nombre de descendants infectés (D _i) ...	68	86	46
Nombre de descendants stabilisés (D _{st}) ..	28	47	37
Rapport $\frac{D_i}{D}$	0,15	0,17	0,26
Rapport $\frac{D_{st}}{D_i}$	0,41	0,54	0,80

On constate que la fréquence des cystes de la classe A parmi l'ensemble des cystes virosés est très voisine, dans chaque tranche, de la fréquence des individus stabilisés parmi les descendants infectés.

Les χ^2 d'homogénéité sont de : 0,294 pour la 1^{re} tranche ; 0,853 pour la 2^e tranche ; 0,033 pour la 3^e tranche. Ils sont donc loin d'être significatifs. La somme des χ^2 est égale à 1,180 ; avec 3 degrés de liberté, elle est également très loin d'être significative.

Nous avons vu plus haut que la pente de droite de régression est égale à 3,4 pour la première fréquence et 2,7 pour la seconde ; ces deux pentes ne diffèrent pas non plus significativement, leur différence étant égale à $0,70 \pm 0,97$.

TABLEAU II. — Résultats obtenus sur les cystes ovariens des femelles injectées avec σ . Evolution de diverses catégories de cystes au cours de 3 tranches de temps successives.

	1 ^{re} TRANCHE	2 ^e TRANCHE	3 ^e TRANCHE
Nombre total de cystes (C)	45	52	39
Nombre de cystes infectés (C _i)	23	27	28
Nombre de cystes de la classe A (C _a) ...	8	12	23
Rapport $\frac{C_i}{C}$	0,51	0,52	0,72
Rapport $\frac{C_a}{C_i}$	0,35	0,44	0,82

Mais il est important de remarquer que la fréquence des cystes virosés parmi l'ensemble des cystes broyés est très supérieure à la fréquence des individus sensibles parmi les descendants. Le rapport de ces 2 fréquences est égal à : 3,47 pour la 1^{re} tranche ; 3,06 pour la 2^e tranche ; 2,77 pour la 3^e tranche.

Il y a donc en gros, 3 fois plus de cystes virosés que de descendants infectés. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

IV. — DISCUSSION

Comme dans toutes les expériences effectuées sur les cystes 10B (Bregliano [1, 3]), les rendements viraux se répartissent en 3 classes. La différence essentielle entre la distribution présentée ici et celle que nous avons obtenue antérieurement avec la même souche virale [4] réside dans la classe A qui semble elle-même bimodale. Comme nous l'avons vu, ceci est dû au fait que les femelles jeunes ont fourni des cystes A dont les rendements sont situés autour de 3 U. log, alors que chez les femelles âgées d'une trentaine de jours les rendements de ces mêmes cystes voisinent 3,8 U. log. Ces dernières mouches fournissant surtout des cystes de la classe A, il n'est pas possible de savoir si un décalage comparable se retrouve à l'intérieur des classes B et C. Il ne le semble pas en ce qui concerne la première. Cette différence de rendement à l'intérieur de la classe A entre les femelles jeunes et les femelles âgées s'explique sans doute par le fait que l'ovogénèse étant plus lente chez ces dernières, le virus bénéficie d'un temps plus grand pour se multiplier. Le même enrichissement devrait s'observer au cours de la vie des femelles stabilisées. Nous ne possédons malheureusement pas de données suffisamment précises sur ce point.

Considérons maintenant l'évolution des 3 classes de cystes au cours du temps. La fréquence de la classe A augmente considérablement chez les femelles âgées, celle de la classe C diminue très vite, quant à la classe inter-

médiaire elle semble se comporter comme A au début, puis comme C. Il ne faut pas oublier cependant que cette classe B est très réduite en effectifs ; on ne peut donc attacher beaucoup d'importance aux résultats qui la concernent.

Il est important de remarquer également que notre expérience ne porte pas sur un passage au germe complet ; en effet, la fréquence des descendants sensibles chez les femelles que nous avons étudiées croît assez lentement et n'atteint son maximum que vers le 30^e jour après l'inoculation, à un moment où nous avons dû arrêter l'expérience à cause de la mortalité des femelles. Cette lenteur dans l'évolution du passage au germe est sans doute en relation avec le fait que le rythme de ponte des femelles est très faible ; nous aurons l'occasion de revenir sur ce point dans la discussion générale. En tout cas, il ne nous est pas possible de savoir avec certitude si la fréquence des cystes A continue à croître dans la phase de redescende du passage au germe. Ceci fera l'objet de travaux ultérieurs.

En ce qui concerne le classement des descendants sensibles, quelques réserves sont également à faire sur le degré de précision des données expérimentales. La méthode du traitement thermique nous permet de déceler à coup sûr les individus néo-stabilisés, sauf s'ils ont subi un « décrochage » dans leurs cellules germinales, ce qui les fait alors classer parmi les mosaïques ; mais cet accident est très rare avec la souche virale que nous utilisons. Par contre, comme cela a déjà été signalé, il est plus difficile de distinguer les femelles mosaïques des non-stabilisées. Comme nous l'avons dit, nous avons décidé arbitrairement d'inclure dans les non-stabilisées les femelles donnant après traitement un pourcentage de descendants sensibles inférieur à 10 p. 100. Il est évident que dans ces conditions nous classons certaines femelles mosaïques parmi les non-stabilisées. C'est pour cette raison que, pour la première expérience, nous n'avons pas présenté séparément les résultats concernant ces deux catégories (fig. 4). Nous avons pensé, en revanche, qu'au niveau des descendances individuelles leur observation pouvait apporter quelques informations. C'est pourquoi nous avons représenté l'évolution des 3 classes sur les figures 5 et 6. Nous reviendrons plus loin sur l'interprétation de ces courbes.

Les données recueillies sur l'évolution des 3 types de descendants sensibles appellent la même remarque que nous avons faite précédemment à propos des cystes ovariens, à savoir que notre étude ne porte en fait que sur la phase ascendante du passage au germe. Ni la première expérience, ni la seconde ne nous permettent d'affirmer que la fréquence des individus stabilisés continue à croître dans la phase descendante.

Si nous comparons maintenant les résultats obtenus avec les cystes infectés et les résultats obtenus avec les descendants sensibles, nous voyons que, pour chaque tranche d'âge, la fréquence des cystes du type A parmi les premiers est très voisine de celle des individus stabilisés parmi les seconds. Comme d'autre part la quantité d'unités infectantes contenue dans ces mêmes cystes est identique à la quantité contenue dans les cystes de femelles stabilisées (donc destinés à donner des individus du même type), nous sommes amenés à penser que les descendants stabilisés des femelles injectées sont issus des cystes de la classe A.

Il est intéressant également de remarquer que l'évolution des cystes de la classe B semble analogue à celle des descendants mosaïques chez les femelles A et E (fig. 5 et 6). Ceci est particulièrement net chez cette dernière. Il est donc également plausible qu'il existe une certaine correspondance entre ces 2 catégories.

Tout ceci peut nous amener à d'intéressantes conclusions concernant l'état stabilisé ; nous ne pouvons cependant aborder ce problème sans avoir expliqué l'excès considérable de cystes infectés par rapport aux descendants sensibles. Ceci fera l'objet d'un article ultérieur, nous reprendrons alors la discussion concernant l'état stabilisé.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les informations sûres apportées par les expériences décrites ici peuvent se résumer en 2 points.

— Présence de 3 classes de rendements au niveau des cystes 10B ; ce qui n'est en fait qu'une confirmation de résultats déjà publiés [4].

— Accroissement avec l'âge des femelles de la fréquence des cystes à rendements élevés.

Ceci nous amène à poser le problème de l'origine de ces 3 classes de cystes infectés, qui concerne en fait tout le mécanisme du passage au germe. Rappelons que ce phénomène correspond à l'infection, localisée dans le temps, de la lignée germinale. Ceci se traduit dans la descendance, par l'apparition vers le 10^e jour suivant l'inoculation, d'une fraction d'individus sensibles au CO₂, dont la fréquence augmente, passe par un maximum, puis diminue graduellement pour redevenir nulle vers la fin de la vie de la mouche. Il existe des cas où cette fréquence au lieu de diminuer, se maintient à un plateau ; mais ils ne diffèrent sans doute pas fondamentalement du cas classique que nous venons de décrire. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

Nous avons déjà abordé le problème de l'origine des 3 classes de cystes [4] et montré qu'elles ne peuvent être dues à 3 types viraux génétiquement différents. Leur présence ne peut donc qu'être la conséquence de 3 modalités d'infection distinctes. Cette expression signifiant qu'il existe pour le virus, soit 3 manières de pénétrer dans un cyste ovarien, soit 3 étapes de l'ovogénèse auxquelles il peut commencer sa replication.

Nous avons de plus montré que ces modalités ne peuvent porter sur la localisation histologique de l'infection virale. Ajoutons encore que l'une au moins d'entre elles, celle qui est à l'origine de la classe A, ne peut correspondre à une infection tardive, telle que la suppose Brun [4]. En effet, les cystes 10B appartenant à cette classe sont aussi riches en U.I. que les cystes prélevés sur les femelles stabilisées, qui sont infectés dès le stade ovogonial. Il paraît peu probable qu'en 2 ou 3 jours la multiplication virale puisse rattraper un retard d'une douzaine de jours. De plus, il peut arriver que les germariums de femelles infectées contiennent déjà quelques dizaines d'U.I., ce qui semble indiquer que l'infection est possible avant l'individualisation des cystes donc plus de 6 jours avant la ponte. Remarquons quand

même qu'elle ne doit pas être très proche du stade ovogonial, puisqu'au stade 7 la différence de rendement avec les cystes stabilisés est encore considérable et qu'elle ne disparaît qu'au stade 10 B.

Trois types d'hypothèses sont possibles selon que les modalités concernent le virus, les circonstances fortuites de l'infection ou l'état du cyste lui-même.

Hypothèse a : Choix déterminé par les particules virales infectantes

Deux possibilités se présentent selon que la variation porte sur la quantité ou sur la qualité des particules ; dans le premier cas, on ne peut expliquer la présence des 3 classes qu'en invoquant 3 multiplicités d'infection bien distinctes ; ce qui paraît très peu vraisemblable. Dans le second cas, il faut imaginer 3 types de particules virales qui diffèreraient par leur aptitude à fournir une récolte plus ou moins importante dans les cystes ovariens. Les différences ne doivent d'ailleurs pas être de nature génétique sinon un simple p.g. suffirait à obtenir la purification de chacun des 3 types. Elles ne peuvent guère porter que sur le délai qui peut s'écouler entre la pénétration du virus dans le cyste et le début de sa multiplication, délai qui serait bref pour les particules donnant une récolte importante et long pour celles qui donnent une récolte faible.

La présence de ces 3 types n'est pas elle-même invraisemblable ; on sait que les particules infectieuses produites par un cycle de multiplication dans la drosophile présentent une hétérogénéité quant à leurs propriétés physiques. Celle-ci se décèle dans les centrifugations en gradient de densité (Plus [14]) et aussi dans l'inactivation spontanée *in vitro* (Wastl [15]) ou provoquée *in vivo* par un traitement thermique (Lestrangé [12]).

Ce qui est beaucoup moins satisfaisant dans une telle hypothèse, c'est qu'il faut admettre, pour expliquer les courbes de la figure 2, que les fréquences relatives des 3 catégories de particules varient pendant la durée de la vague d'infection. Une telle variation pourrait se concevoir, si l'on imagine la production de trois types de particules virales par 3 tissus différents de la mouche. Ceux-ci libéreraient leur récolte de façon échelonnée, les particules responsables de la classe A étant libérées en dernier : il faut alors admettre que ces dernières se multiplient lentement dans les tissus somatiques et rapidement dans les cystes ovariens, ce qui n'est pas strictement impossible, mais rend l'hypothèse bien complexe et donc peu satisfaisante.

Hypothèse b : Choix déterminé par des circonstances fortuites de l'infection

Nous avons déjà vu [1] que ces circonstances ne pouvaient être la localisation histologique de l'infection, car il ne semble pas qu'il existe de corrélation entre l'appartenance d'un cyste ovarien à l'une des classes A, B ou C et la localisation préférentielle des virions dans l'un des trois types cellulaires qui le constituent. On peut imaginer cependant que ces circonstances soient des hasards moléculaires, comme dans le cas des bactériophages tempérés pour l'alternative lysogénie ou cycle lytique.

Ce type d'hypothèse ne peut être retenu car si le hasard détermine seul l'appartenance d'un cyste à l'une des 3 classes, on ne peut expliquer

l'évolution régulière de celles-ci au cours du temps, évolution impliquant que les cystes les plus riches en U.I. sont situés en amont des autres dans les ovarioles.

Hypothèse c : Choix déterminé par l'état du cyste au moment de l'infection

Il n'y a guère d'autres différences d'état concevables que celles qui concernent le stade d'évolution. Ceci revient à admettre que les 3 classes de rendement correspondent à 3 stades d'infection possibles pour un cyste ovarien. L'un d'eux étant suffisamment précoce pour aboutir à une récolte très abondante. Cette hypothèse paraît, de loin, la plus simple et la plus satisfaisante, pour expliquer l'évolution des 3 classes au cours du temps. On peut la développer de la manière suivante.

Il se produirait à une certaine étape de la multiplication virale dans la drosophile, une vague d'infection en direction de la lignée germinale. On peut alors supposer, soit que les cystes ne peuvent être infectés qu'à trois stades d'évolution déterminés, soit que l'ARN viral ne peut démarrer sa réplication qu'à trois étapes de l'ovogénèse. Dans les deux cas, on aboutirait à la présence dans chaque ovariole d'un certain nombre de cystes virosés, d'autant plus proches de l'extrémité apicale qu'ils ont été infectés plus précocement. Si l'on admet qu'un cyste fournit un rendement d'autant plus élevé au stade 10B qu'il a été infecté plus tôt, ce qui est très vraisemblable, on explique très aisément l'évolution des 3 classes au cours du temps. Nos connaissances sur le déroulement de l'ovogénèse peuvent nous permettre d'avoir une estimation de la durée de la vague infectante. En effet, comme nous l'avons rappelé plus haut, un ovariole de drosophile contient à tout moment 6 cystes bien individualisés et 10 autres en voie de formation. Lors d'un passage au germen, entre le moment où apparaissent les premiers descendants sensibles au CO_2 et celui où les derniers sont pondus, les femelles donnent naissance à un nombre de 10 à 14 individus (virosés ou non) en moyenne par ovariole. Ces chiffres ont été observés sur un grand nombre de descendance de femelles injectées. Si l'on tient compte du pourcentage d'éclosion, on aboutit à une moyenne de 11 à 16 œufs par ovariole. Très souvent 2 ou 3 d'entre eux seulement sont infectés; dans ce cas-là, comme notre hypothèse suppose au moins 3 stades distincts favorables à l'infection, une vague infectante très brève suffit à expliquer le passage au germen. Lorsque le nombre de descendants sensibles au CO_2 correspond à 7 ou 8 cystes par ovariole, comme chez les femelles A et E de la deuxième expérience, une vague d'une durée de 2 à 3 jours suffit à expliquer les résultats. Il faut remarquer d'ailleurs que l'aspect des courbes d'évolution des 3 classes de rendement (fig. 2), notamment la pente accentuée donnée par la classe C, ne s'explique aisément qu'en admettant que le pool de cystes infectés est entièrement constitué avant que nous ayons commencé les dissections, c'est-à-dire en fait avant l'apparition d'individus infectés dans la descendance.

Des observations intéressantes en faveur de la brièveté de la vague infectante ont été faites par N. Jupin [8]. Cet auteur a dosé le contenu viral de cystes au stade 14 prélevés dans les ovarioles contenant chacun 2 ou 3 de ces stades; accumulation anormale d'ailleurs, probablement due à un

ralentissement assez prononcé des cystes 14 virosés. Il a été observé que, dans beaucoup de cas, 2 cystes contigus dans un même ovariole sont tous deux infectés. Les femelles utilisées ne donnant au cours de leur vie, qu'une moyenne de 1,5 à 3 descendants sensibles, le fait qu'ils soient contigus ne peut s'expliquer que par une vague d'infection très localisée dans le temps.

Dans cette optique, la grande variabilité du nombre de descendants sensibles selon les femelles pourrait être due à une variabilité dans la durée de la vague infectante.

Remarquons qu'un tel mécanisme doit aboutir à une augmentation continue de la fréquence des cystes de la classe A, jusqu'à la fin du passage au germen. Nous avons vu que nous ne pouvions affirmer qu'il en est réellement ainsi puisque nos données ne recouvrent que la phase ascendante du p. g. Il sera donc intéressant de compléter nos observations ultérieurement.

Il faut maintenant confronter cette hypothèse avec les données acquises antérieurement sur le passage au germen. Ces données sont issues essentiellement des travaux de Brun [4] et résultent, d'une part, d'expériences de traitement thermique des femelles inoculées, d'autre part, d'une étude de la cinétique du p. g.

DISCUSSION DES FAITS EXPÉRIMENTAUX ACQUIS ANTÉRIEUREMENT

1° *Expériences de traitements thermiques de femelles injectées.*

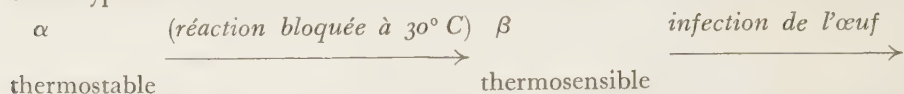
Brun a inoculé un extrait viral à plusieurs lots de drosophiles femelles normalement élevées à 20° C; certains d'entre eux ont été placés à 30° C au début de l'apparition des individus infectés dans la descendance et y ont été maintenus durant une période de 1, 2, 3, 5, 7 ou 10 jours, selon les lots. Il constate que chez les femelles traitées 48 heures et plus, les descendants sensibles au CO₂ disparaissent totalement, puis reparaissent à partir du 3^e jour qui suit la fin du traitement et la fréquence qu'ils atteignent est sensiblement identique quelle que soit la durée de ce traitement. Brun ne possède malheureusement aucune donnée sur la nature stabilisée ou non de ces descendants. D'autres lots de femelles placées à 30° C à partir du moment où la fréquence de leurs descendants infectés commence à diminuer, ne donneront plus que des individus sans virus après la fin du traitement même s'il n'excède pas 48 heures.

Brun interprète ces résultats de la manière suivante :

Pour le virus infectant la lignée germinale existerait une phase α thermostable et transitoire, présente dans les cellules susceptibles d'infecter les cystes avant la production par celles-ci d'une récolte infectieuse, et suivie dans l'évolution normale, d'une phase thermosensible β seule capable de pénétrer et de se multiplier dans les cystes. Le traitement à 30° C bloquerait la transformation d' α en β et du même coup l'infection du germen, permettant aux lots chauffés en début de p. g. de repartir au même point après retour à 20° C.

Le délai de 3 jours entre la fin du traitement et la réapparition des descendants sensibles au CO₂ amène Brun à conclure que l'infection des

cystes a lieu au maximum 3 jours avant la ponte. Il faut également supposer qu'elle s'étend sur une période relativement longue. On peut schématiser cette hypothèse de la manière suivante :



Remarquons tout de suite qu'une telle interprétation ne permet pas d'expliquer la présence de la classe de rendement A, qui ne peut résulter, comme nous l'avons déjà dit, d'une infection aussi tardive, quelle que soit d'ailleurs l'hypothèse choisie pour expliquer les 3 modalités. Dans le cadre de la dernière de ces hypothèses, qui nous intéresse ici, on peut remarquer que les faits expérimentaux réunis par Brun n'excluent pas la présence de 3 stades distincts d'infection, ils permettent tout au plus de localiser le stade le plus tardif.

Comment concilier l'ensemble de ces faits expérimentaux avec notre hypothèse ?

La difficulté réside pour nous dans l'interprétation du p. g. résiduel apparu après le traitement. Si nous admettons que le passage au germen est dû à une vague d'infection brève suivie d'une ponte progressive de cystes infectés, cette vague est très probablement terminée au moment où Brun applique son traitement (puisqu'il apparaît déjà des descendants sensibles au CO_2). Ce p. g. résiduel ne peut donc s'expliquer dans notre hypothèse par la reprise d'une vague d'infection interrompue par le chauffage. De plus, la disparition rapide des descendants infectés chez les femelles traitées implique pour nous la guérison complète du *pool* de cystes virosés (une telle guérison n'est pas nécessaire dans l'interprétation de Brun, puisqu'il situe le moment d'infection dans une période de 1 à 3 jours avant la ponte).

Comment dans ces conditions expliquer la réapparition des descendants infectés après le retour à 20°C . ?

Avant tout, il peut être intéressant de signaler que dans les expériences de Brun, la totalité des descendants infectés fournis par une femelle après la fin du traitement, correspond au maximum à 20 individus ; c'est-à-dire à un cyste infecté en moyenne pour 2 ovarioles, alors que les lots témoins étudiés par cet auteur, ont donné une moyenne de 5 à 8 descendants virosés par ovariole. Les p. g. apparus après chauffage ne représentent donc, au mieux, que le dixième du p. g. normal.

On ne peut invoquer la présence de cystes virosés ayant échappé à la guérison, car il est pratiquement impossible d'expliquer que leur nombre ne dépende pas de la durée du traitement thermique. L'explication la plus probable est qu'il y a réellement reprise du processus normal d'infection ; autrement dit qu'une nouvelle vague de particules infectantes d'amplitude d'ailleurs très faible, peut à nouveau atteindre la lignée germinale lorsque le chauffage a commencé assez tôt dans la vie de la mouche. Ceci n'est pas fondamentalement différent de l'interprétation donnée par Brun, sinon que nous invoquons une nouvelle vague nettement séparée de la première et provoquée par le traitement thermique.

2° Cinétique du passage au germen.

Brun a montré que la cinétique des courbes du p. g. est en accord qualitatif et quantitatif avec l'hypothèse de l'épuisement par les ovocytes d'un stock de particules infectantes au fur et à mesure du déroulement de l'ovogénèse [5]. Une telle hypothèse donne, en effet, une courbe dont la branche descendante se traduit par une droite après la transformation en log (-L) et c'est également le cas des redescentes observées par Brun sur un certain nombre de p. g. expérimentaux.

Notre hypothèse qui suppose 3 portes d'entrée possibles pour σ au cours de l'ovogénèse et épuisement du *pool* de cystes infectés par une vague très brève, doit aboutir à une tout autre cinétique. Chacune des 3 classes de cystes s'élimine suivant une courbe de Gauss. L'allure générale de la redescente est donnée par la branche descendante de la courbe d'élimination de la classe A puisque celle-ci est numériquement la plus importante à la fin.

Ceci est évidemment très différent des conclusions auxquelles Brun aboutit. Cependant, dans la réalité plusieurs facteurs interviennent pour modifier cette cinétique théorique : hétérogénéité entre les femelles d'un même lot, ralentissement global du rythme de ponte avec l'âge, hétérogénéité de fonctionnement entre ovarioles d'une même femelle. Ces facteurs auront tous pour effet d'étaler la partie descendante de la courbe de Gauss donnée par la classe A et de lui donner un aspect se rapprochant de celui qu'a décrit Brun.

En fait, il ne nous paraît pas opportun de donner trop d'importance à une étude théorique de la cinétique, car les courbes de passage au germen obtenues expérimentalement sont loin d'avoir un aspect constant. A ce sujet une remarque s'impose. Dans une publication antérieure [4] nous avons signalé qu'une des particularités de la souche virale Z est de donner un p. g. prolongé, ce qui signifie que la fréquence des descendants sensibles au CO_2 reste uniforme pendant un temps relativement long. En fait, nous avons pu observer au cours des nombreuses expériences effectuées que les courbes obtenues sont très diverses, allant du type le plus classique au type dit « prolongé » qui est tout de même le plus fréquent. Bien que nous n'ayons pas fait d'études systématiques sur ce sujet, nous croyons pouvoir affirmer que ces variations sont associées à celles du rythme de ponte. Quand ce dernier est rapide la courbe de p. g. présente très tôt un maximum suivi d'une redescente assez prononcée ; quand il est lent, la courbe présente un étalement qui peut aller jusqu'à figurer un plateau.

Des observations analogues se retrouvent également dans les travaux de Brun [4]. Il resterait à connaître l'origine de ces variations du rythme de ponte. Elles peuvent être dues aux conditions physiologiques des femelles injectées ou à une grande variabilité génétique de σ dans l'aptitude à ralentir les cystes ovariens. Nous possédons trop peu de données pour choisir entre ces 2 explications.

Ainsi, étant donné la variabilité du phénomène, l'incompatibilité entre l'étude de Brun sur la cinétique et notre interprétation, paraît se situer sur un plan trop théorique pour être prise en considération.

Dans l'ensemble, bien que beaucoup d'incertitudes subsistent sur le

mécanisme du p. g., il semble qu'un certain nombre de points intéressants puissent être retenus :

— La barrière qui s'oppose aux virions du type g^- paraît se situer au niveau du fourreau des ovarioles [3].

— Il existe au moins 3 stades d'infection possibles pour un cyste ovarien de femelle infectée, dont un relativement précoce.

— Il semble que la vague d'invasion germinale soit très localisée dans le temps.

Des études plus approfondies seront nécessaires pour préciser davantage ce mécanisme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BREGLIANO (J. C.). Etude de la quantité de virus σ infectieux contenue dans les cystes ovariens de *Drosophiles* stabilisées et inoculées. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **409**, 638-651.
- [2] BREGLIANO (J. C.). Etude des variations de la quantité infectantes du virus σ au cours des diverses phases du cycle de son hôte : *Drosophila melanogaster*. *Thèse Fac. Sci. Clermont*, 1969, ref. C.N.R.S., A.O. 3446.
- [3] BREGLIANO (J. C.). Contribution à l'étude des relations entre le virus σ et son hôte. Etude du caractère g^- . *Ann. Inst. Pasteur*, 1969, **417**, 325-338.
- [4] BRUN (G.). Etude d'une association du virus σ et de son hôte la *Drosophile* : l'état stabilisé. *Thèse Biol. exp.*, Orsay, 1963.
- [5] BRUN (G.) et SIGOT (A.). Etude de la sensibilité héréditaire au gaz carbonique chez la *Drosophile*. — II. Installation du virus σ dans la lignée germinale à la suite d'une inoculation. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 488-513.
- [6] DAVID (J.). Etude quantitative du développement de la *Drosophile* élevée en milieu axénique. *Bull. biol. France-Belgique*, 1959, **93**, 472-505.
- [7] DAVID (J.). Etude quantitative du fonctionnement ovarien chez *Drosophila melanogaster* meig. *Bull. biol. France-Belgique*, 1961, **3**, 522-535.
- [8] JUPIN (N.). Action du virus σ sur le rythme de ponte de la *Drosophile*. *Diplôme Fac. Sci.*, Orsay.
- [9] KING (R. C.). Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. — II. Stage distribution as a function of age. *Growth*, 1957, **21**, 95-102.
- [10] KING (R. C.) and DEVINE (R. L.). Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. — VII. The submicroscopic morphology of the ovary. *Growth*, 1958, **22**, 299-326.
- [11] KING (R. C.), RUBINSON and SMITH (R. F.). Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. *Growth*, 1956, **20**, 121-157.
- [12] KOCH (E. A.) and KING (R. C.). The origin and early differentiation of the egg chamber of *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.*, 1966, **419**, 283-304.
- [13] LESTRANGE (M. T. de). Contribution à l'étude du virus héréditaire de la *Drosophile*. Action de la température sur le contenu en virus des tissus somatiques de l'hôte. *Thèse Fac. Sci.*, Orsay, 1963.
- [14] PLUS (N.). Comportement du virus sigma de la drosophile en centrifugation en gradient de densité de saccharose. *C. R. Acad. Sci.*, 1962, **255**, 3498-3500.
- [15] WASTL (A.). Inactivation du virus sigma de la drosophile *in vitro* à 0° C. *Diplôme Fac. Sci.*, Orsay, 1962.

